

УДК 574.21+574.24:546.4:582.475.2

**ПРОДУЦИРОВАНИЕ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИХ СЕРУСОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ
В ХВОЕ ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PICEA ABIES (L.) KARST.*) В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ УСЛОВИЙ ПРОИЗРАСТАНИЯ**

В. С. Дорошкевич, А. Н. Шендрик

Определено содержание меди и цинка, белка, серусодержащих соединений в хвое Ели обыкновенной (*Picea Abies (L.) Karst.*) в экологически чистых регионах Украины (АР Крым) и в городах с интенсивной промышленностью (г. Донецк, Мариуполь, Краматорск, Запорожье, Артемовск). Показано, что с увеличением степени загрязнения окружающей среды соединениями тяжелых металлов в хвое Ели обыкновенной (*Picea Abies (L.) Karst.*) интенсифицируются процессы выработки специфичных белков и серусодержащих соединений.

Ключевые слова: металлотионеины, метод Лоури, мониторинг, загрязнение окружающей среды, тяжелые металлы, колоночная хроматография, атомно-эмиссионная спектроскопия.

Введение. На большинство живых организмов тяжелые металлы оказывают двойное действие: с одной стороны, они необходимы для жизнедеятельности биологических систем, с другой - могут быть токсичными. Существует огромное количество примеров, демонстрирующих негативные последствия дефицита меди, железа, цинка, кобальта, марганца и других металлов в клетках [1-3]. В основном, при устранении недостатка микроэлементов, растения возвращаются в нормальное состояние. При поступлении большого количества токсикантов происходит их накопление и, как следствие, гибель. Однако, в большинстве случаев, концентрация металлов в тканях поддерживается строго постоянной в течение всей жизни. Для сохранения общего баланса функционируют системы, препятствующие накоплению токсичных веществ. Существует общее мнение, что у организмов различного уровня организации в процессе эволюции сформировался механизм детоксикации, в основе которого лежит связывание и изоляция токсичных ионов металлов. При этом, основную роль выполняют специальные белки - металлотионеины. Синтез данного типа белков индуцируется при поступлении как меди и цинка, так и других тяжелых металлов.

Целью настоящей работы было выделить металлсвязывающие серосодержащие белки и сравнить содержание белков в хвое Ели обыкновенной (*Picea abies (L.) Karst.*) произрастающей в участках с различной техногенной нагрузкой по ионам тяжелых металлов меди, цинка, железа, свинца.

Постановка задачи и материал исследования. Для реализации цели были запланированы следующие задачи. Выяснить степень загрязнения медью и цинком хвои деревьев, произрастающих в местах отбора проб. Провести ранжирование испытываемых участков по степени загрязненности на контрольную, парковую и промышленную зоны. Рассмотреть каждый объект исследования на предмет изменения морфологии поверхности хвои. Определить биохимические показатели: общее содержание белка, серусодержащих соединений. Провести фракционирование цитоплазматического белка посредством колоночной хроматографии и сопоставить его содержание с серусодержащими соединениями в каждой фракции.

В качестве объекта исследования была выбрана годичная хвоя, отобранная до периода вегетации. Хвою отбирали в городах Украины с интенсивно развитой промышленностью (г.г. Донецк, Мариуполь, Краматорск, Запорожье, Артемовск, Макеевка) и, для сравнения, в зонах условного контроля - курортных городах АР Крым (г.г. Ялта, Алушта) и Донецкой области (г. Славянск, п.г.т. Урзуф). В табл. 1 приведено расположение участков отбора проб.

Таблица 1
Характеристика участков произрастания Ели обыкновенной (*Picea abies (L.Karst.)*)

№	Район произрастания	Расположение участка	
1	Донецкая область: г. Славянск, сан. «Донбасс», п.г.т. Урзуф	Курортные зоны, крупные промышленные предприятия отсутствуют или не работают.	
	п.г.т. Мигово, Закарпатская область, Украина	Горно-лыжный курорт	
	АР Крым	г. Алушта, Ялта	Курортные города на побережье Черного моря
		поселок Краснокомянка Ялтинского региона, г. Ялта	Выращивают виноград сорта белый мускат.
	Гора «Эклизи Бурун», плато Чатыр-Даг.	Подножье горы.	
2	г. Краматорск, парк «Юбилейный», г. Мариуполь, «Приморский парк»	Парковые зоны расположены практически в центре города, по периметру расположены автодороги.	
3	г. Донецк, парк им. Щербакова	Расположен в центре города. Вблизи парка Донецкий металлургический завод (ДМЗ) – один из крупнейших металлургических заводов Украины.	

Табл. 1 (продолжение)

4	г. Донецк, Ботанический сад НАН Украины	Располагается за городом, поблизости нет промышленных предприятий. Уровень техногенного и отрицательного антропогенного воздействия относительно низок.
5	г. Краматорск, ул. Социалистическая, г. Донецк, ул. Университетская	Уличное озеленение, участки расположены на разделительной полосе дороги с достаточно интенсивным движением.
6	г. Краматорск, территория Новокраматорского машиностроительного завода (НКМЗ)	НКМЗ является крупнейшим предприятием машиностроения, специализируется на выпуске деталей, изготовленных из специальных легированных сталей. Цинк, никель, хром используются для покрытия деталей
7	г. Запорожье, завод «Запорожсталь»	Одно из крупных промышленных предприятий Украины. Производитель, экспортер чугуна, стали, проката
8	г. Курахово, район Кураховской теплоэлектростанции СЕ ООО «Востокэнерго»	Тепловая электростанция в Марьинском районе Донецкой области, мощность электростанции составляет 1460 МВт (1 блок мощностью 200 МВт и 6 блоков – 210 МВт). Работает на отходах угольной промышленности.
9	Трасса Донецк – Мариуполь, г. Донецк, автовокзал «Путиловский»	Участки с очень интенсивным автомобильным движением.
10	г. Артемовск, территория железнодорожного вокзала	Станция обслуживает пригородные поезда и поезда дальнего следования.

Экспериментальная часть. Уровень техногенной нагрузки испытуемого участка определяли по содержанию меди и цинка на поверхности хвои методом атомно-эмиссионной спектроскопии с использованием спектрометра СЭВ – 30 (Украина, «СЕЛМИ»). Поверхность хвои исследовали на сканирующем электронном микроскопе JSM 6490 LV (Япония). Водорастворимые цитоплазматические белки после выделения [4] разделяли с помощью колоночной гель-хроматографии на Sephadex G-75 (Pharmacia, Швеция) с соблюдением соответствующих условий [4]. Для определения содержания белка в фракциях использовали модифицированный метод Лоури [5]. Количество SH-групп определяли по образованию метиленовой сини при взаимодействии с N,N-диметиламиноанилином в присутствии железа (III) при длине волны $\lambda = 665 \text{ нм}$ [6].

Результаты исследований. Посредством сканирующей электронной микроскопии на поверхности хвои взятой из экологически неблагоприятных районов были обнаружены скопления инородных тел, которые состоят преимущественно из SiO₂, оксидов железа и цинка, сульфидов свинца и цинка, а также карбонатов кальция и магния. Общий вид поверхности хвои (увеличение 120 раз) и устьиц (увеличение 1000 раз) представлен на рис. 1.

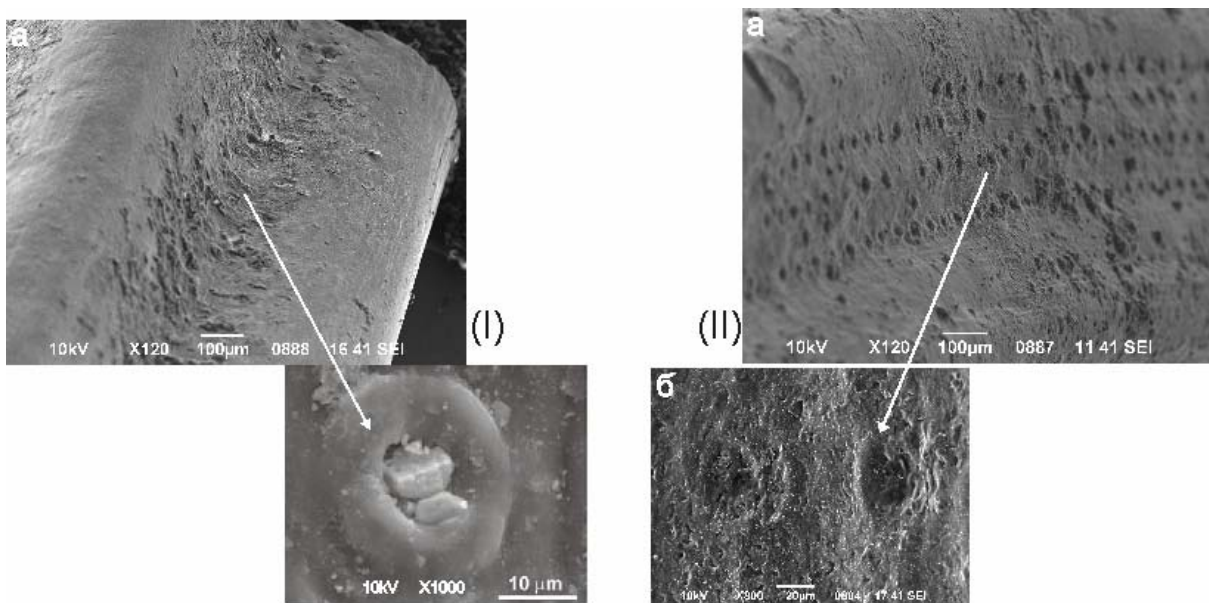


Рис. 1. Микрофотографии поверхности хвои (а) и устьиц (б) Ели обыкновенной (*Picea abies* (L.) Karst.), произрастающей в загрязненной (I) и экологически - чистых (II) зонах.

На поверхности хвои экологически чистых регионов Крыма (г.г. Алушта, Ялта) и Закарпатья (с. Мигово) подобные агломераты отсутствуют. В отдельных объектах хвои годичного прироста имеется засоренность транспирационных ходов.

Для ранжирования исследуемых участков по зонам техногенной нагрузки определяли содержание тяжелых металлов. Валовое содержание меди в диапазонах 1-40 мг/кг соответствовало контрольному

участку, територіально отнесенному к парковым и курортным местам. От 40-230 мг/кг к зоне средней техногенной нагрузки. Более 230 мг/кг определено в городах с высоко развитой промышленностью – промышленным зонам. Участки по содержанию цинка разделились следующим образом: 1-90 мг/кг, 100-160 мг/кг и более 160 мг/кг для контрольной, магистральной и промышленной зон соответственно.

Данные атомно-эмиссионного анализа по меди и цинку наглядно отображены на рис. 2 и рис. 3.

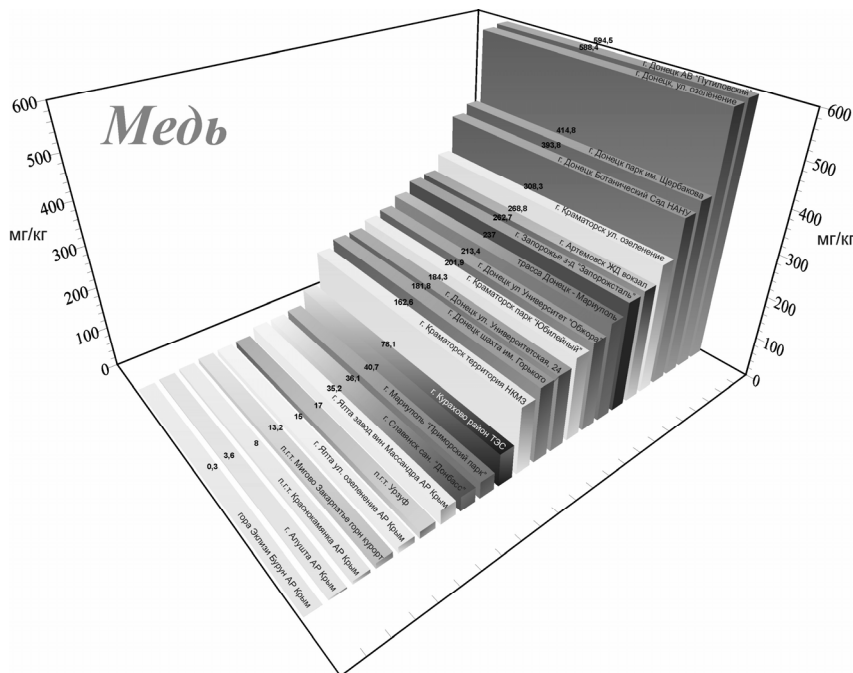


Рис. 2. Содержание меди в хвое Ели обыкновенной (*Picea abies* (L.) Karst.)

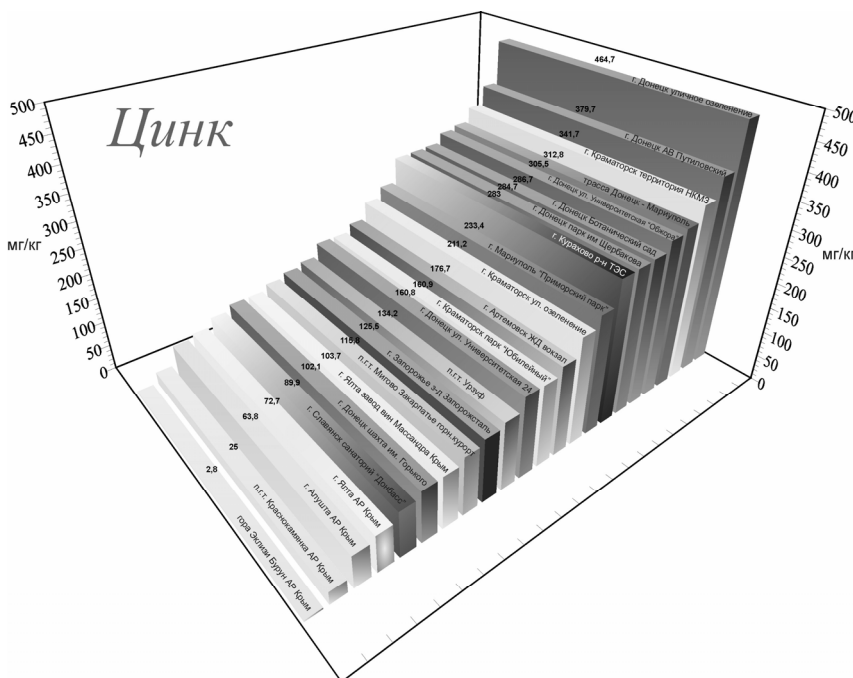


Рис. 3. Содержание цинка в хвое Ели обыкновенной (*Picea abies* (L.) Karst.)

Содержание металлов представлено в порядке увеличения концентраций. В хвое ели, произрастающей на участках Донецкой области, содержание металлов рознится по меди в 3,2, а по цинку – 4,5 раз. Наибольшее количество железа было обнаружено в хвое санитарно - защитной зоны металлургических предприятий г. Мариуполь. Высокие показатели загрязнения свинцом и медью были получены на участках с интенсивным движением автотранспорта.

Наименьшее содержание тяжелых металлов определено в курортных зонах г. Славянска, Закарпаття и АР Крым.

В зависимости от техногенной нагрузки испытываемые участки распределились следующим образом (загрязненность металлами увеличивается в ряду):

Курортные зоны < Краматорск < Артемовск < Донецк.

Деревья, произрастающие на испытываемых участках, сравнивали по морфологическим признакам. Учитывали прирост, длину и количество хвои 1-3 годов роста. Данные отображены в табл. 2.

Таблица 2

Морфологические признаки 1-3 годов прироста

Морфологические признаки	Промышленные зоны	Магистральные зоны	Курортные зоны
Длина побега 1-го года, см	9.7	7.7	7.9
Длина побега 2-го года, см	7.9	4.2	4.9
Длина побега 3-го года	7.3	6.4	5.8
Длина хвои 1-го года, см	2.8	1.9	3.1
Длина хвои 2-го года, см	3.0	2.3	3.5
Длина хвои 3-го года, см	3.2	2.6	4.1
Кол-во хвои на 1 см побега 1-го года, шт.	7.5	10.0	9.3
Кол-во хвои на 1 см побега 2-го года, шт.	6.0	3.0	6.2
Кол-во хвои на 1 см побега 3-го года, шт.	6.3	1.4	4.0

В промышленных зонах, прирост побегов первого года больше предыдущих. Для всех испытываемых участков поверхность хвои увеличивается только на протяжении 1-3 годов роста, в последующие годы рост прекращается. В загрязненных участках длина годовичного прироста больше чем в магистральных и курортных зонах. Можно предположить, что в ответ на необратимую закупорку транспирационных ходов, ель пытается нарастить вегетационную массу за счет увеличения поверхности хвои или ее количества на 1 см². В связи с этим, длина хвои в загрязненных регионах больше, чем в чистых контрольных зонах. При проведении колоночной хроматографии в образцах хвои было получено 8 типов белковых фракции. На рис. 4 показаны фракции цитоплазматического белка, коррелирующие с SH-соединениями.

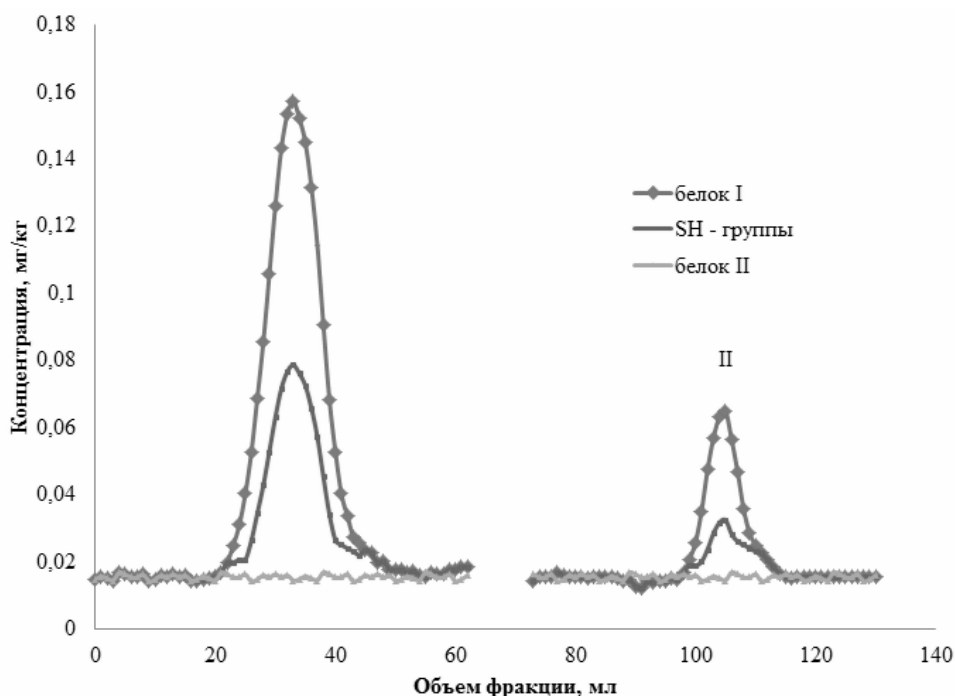


Рис 4. Фрагмент хроматограммы белковых фракций хвои ели, произрастающей в участках с высокой техногенной нагрузкой (I) и в курортных зонах (II).

Во всех фракциях, определяли сумму серусодержащих соединений и содержание белка спектрофотометрическим методом [7]. Оказалось, что у двух типов белка присутствуют SH - соединения. Содержание белка составляло 0,12±0,04 мг/кг в случае первого типа и 0,07±0,02 мг/кг у второго. Как видно из рис. 4, наибольшее содержание белка соответствует объемам 45 мл и 110 мл.

Содержание SH-групп в курортных и промышленных зонах рознится, а общий белок совпадает в пределах погрешности. В хвое деревьев, произрастающих в экологически чистых регионах, обнаружены те же белковые фракции. В них определено низкое содержание суммы серусодержащих соединений.

Используя маркеры низкомолекулярных белков, было определено, что они соответствуют массе в 15 и 85 кДа. Однако, молекулярная масса белков, определенная в ходе эксперимента, отличается от массы металлопротеинов, описанных в литературе [8]. Эти расхождения можно объяснить тем, что хроматография на колонке с сефадексом G-75 позволяет выделить фракции димеров или тетрамеров белков-протеинов.

Выводы. Результаты исследования, касающиеся содержания тяжелых металлов в хвое Ели обыкновенной (*Picea abies (L.) Karst.*) показали, что биосфера индустриального Донбасса сильно загрязнена. Наиболее загрязненным регионом Донецкой области является г. Донецк. Обнаружена корреляция серо-содержащих соединений с некоторыми белковыми фракциями. Белок не соответствует по своим характеристикам металлопротеиновым белкам, найден у хвойных растений произрастающих как в экологически неблагополучных, так и курортных зонах.

РЕЗЮМЕ

Визначено вміст міді і цинку, булку, сірковмісних сполук у хвої Ялини Звичайної (*Picea Abies (L.) Karst.*) в екологічно чистих регіонах України (АР Крим) та в містах з важкою промисловістю (м. Донецьк, Маріуполь, Краматорськ, Запоріжжя, Артемівськ). Показано, що зі збільшенням ступеня забрудненості доквілля сполуками важких металів в хвої Ялини звичайної (*Picea Abies (L.) Karst.*) інтенсифікуються процеси синтезу специфічних білків і сірковмісних сполук.

Ключові слова: металопроїєїни, метод Лоурі, моніторинг, забруднення доквілля, важкі метали, колонкова хроматографія, атомно-емісійна спектроскопія.

SUMMARY

It was detect the content of copper and zinc, protein, sulfur-containing compounds in the needles of Norway spruce (*Picea abies (L.) Karst.*) in the ecologically clean regions of Ukraine (AR Crimea) and in urban areas with intensive industry (Donetsk, Mariupol, Kramatorsk, Zaporozhye, Donetsk). It is shown that with increasing degree of environmental pollution with heavy metals in the needles of Norway spruce (*Picea abies(L.) Karst.*) intensifies the process of making specific proteins and sulfur-containing compounds.

Kewords: Metallothioneins, the method of Lowry, monitoring, pollution, heavy metals, column chromatography, atomic emission spectroscopy.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Эйхорн Г. Неорганическая биохимия / Г. Эйхорн; пер. с англ. М.Е. Вольпина, К.Б. Яцимирского. – М.: Мир, 1978. – 711 с.
2. Derome, J. Effects of heavy metal contamination on macronutrient availability and acidification parameters in forest soil in the vicinity of the Harjavalta Cu–Ni Smelter, SW Finland / J. Derome, A. J. Lindroos // Environ. Pollut. – 1998. – Vol. 99. – P.141-148.
3. Effect of some chemicals on the accuracy of protein estimation by the Lowry method / S. Niamke, L. P. Kouame, J. P. Kouadio et al. // Biokemistri. – 2005. – № 17(2). – P. 73-81.
4. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ. А. А. Баева, К. Г. Скрябина. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
5. Krohn R. I. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein / R. I. Krohn // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2001. – P. B1.1.1-B1.1.28.
6. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
7. Zhou P. Determination of Total Protein Content in Gelatin Solutions with the Lowry or Biuret Assay / P. Zhou, J. M. Regenstien // Journal of Food Science. – 2006. – Vol. 71, № 8. – P. 474-479.
8. Plant metallothioneins / N. J. Robinson, A. M. Tommey, C. Kuske, P. J. Jackson // Biochem J. – 1993. – Vol. 295. – P. 1-10.

Поступила в редакцию 29.03.2010 г.